

CRISPR/Cas – die Geschichte einer bahnbrechenden Entdeckung

DAGMAR WIRTH

Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

Arbeitsgruppenleiterin MSYS – Modellsysteme für Infektion und Immunität

Das CRISPR/Cas-System stellt eine der wichtigsten Entdeckungen der modernen Biologie dar. Es ist ein universelles Werkzeug, das bereits jetzt in vielen Feldern der Biologie und Biotechnologie eingesetzt wird und darüber hinaus den Weg für neue Therapien in der Medizin ebnet. Die Entdeckung der CRISPR/Cas-, 'Genschere' kam allerdings nicht aus heiterem Himmel. Wie viele Durchbrüche in der modernen Wissenschaft wurde auch die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems letztlich durch jahrzehntelange internationale Forschungsaktivitäten verschiedener Labors ermöglicht, die zu einer Reihe von kleinen und auch größeren, aufeinander aufbauenden Ideen und Erkenntnissen beitrugen. Der folgende Beitrag versucht, die wesentlichen Meilensteine, die schließlich zur Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems führen sollten, im geschichtlichen Kontext darzustellen.

So geht die grundlegende Beobachtung, die schließlich in 2012 zur Entdeckung der CRISPR/Cas-Technologie führte, auf das Jahr 1989 zurück. An der Universität in Alicante in Spanien bearbeitete der damals 29-jährige Biologe Francisco Mojica ein doch recht spezielles Thema im Rahmen seiner Doktorarbeit: Er untersuchte das bis dahin noch nicht im Detail charakterisierte Archaeobakterium *Haloferax mediterranei*. Dieses Archaeobakterium lebt unter ungewöhnlichen Umweltbedingungen in den Salzmarschen an der Costa Blanca. Francisco Mojica wollte untersuchen, wie dieses Bakterium in dieser Umgebung überleben kann. Forschungsarbeiten dieser Art dürften zur klassischen Grundlagenforschung zählen – niemand konnte damals erahnen, dass diese Arbeiten den Grundstein für die Identifizierung eines revolutionären, breit verwendbaren Werkzeugs legen sollten, das auch zur Änderung von Genen in menschlichen Zellen einsetzbar ist.

Die Charakterisierung des Archaeobakteriums beinhaltete auch die Sequenzanalyse eines kleinen Genomabschnitts. Derartige Teilsequenzierungen waren zur damaligen Zeit die Regel, denn die damaligen Sequenzieretechnologien waren noch sehr aufwändig und für die Analyse ganzer Genome nicht geeignet. Francisco Mojica stieß bei der Sequenzierung eines Genomabschnitts des Archaeobakteriums auf ein eigenartiges Sequenzmuster: eine Sequenzabfolge von 30 Basenpaaren, die sich mit kurzen Unterbrechungen von ca. 36 Basenpaaren ('Unterbrechungssequenzen') mehrfach wiederholte. Die Gensequenz selbst war bis dahin nicht bekannt und die Tatsache, dass sie sich regelmäßig wiederholte, war sehr ungewöhnlich. Im Rückblick ist interessant, dass bereits 1987 eine japanische Gruppe ein ähnliches wiederkehrendes Sequenzmuster im Genom des Darmbakteriums *Escherichia coli* in einer wissenschaftlichen Publikation beschrieben hatte – allerdings fand diese Beobachtung zu jener Zeit keine weitere Beachtung.

Nachdem Francisco Mojica die Beobachtung der regelmäßig unterbrochenen Sequenzwiederholungen als '*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*' oder kurz CRISPR in einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlichte, passierte zunächst erst einmal nicht viel. Francisco Mojica blieb jedoch an diesem Thema dran. Bis zum Jahr 2000 fand der spanische Forscher – inzwischen Professor an der Universität Alicante – CRISPR Sequenzen auch in etwa 20 anderen Bakterienspezies, so z.B. den Erregern von Tuberkulose und der Pest. Aufgrund der Tatsache, dass ein derartiges Sequenzmuster nicht nur in einem eher exotischen Archaeobakterium zu finden ist, sondern offensichtlich im Reich der Bakterien weit verbreitet ist, weckte diese zufällige Beobachtung zunehmend Interesse. Es wurde immer wahrscheinlicher, dass dieses Sequenzmuster eine zentrale Bedeutung für die Bakterien haben könnte. Entsprechend erregte dieses ungewöhnliche Sequenzmuster nun auch international Interesse und entsprechend wurden in verschiedenen Labors Forschungsaktivitäten ini-



tiert. So wurde in 2002 von einer niederländischen Gruppe ein Gen beschrieben, das im Bakteriengenom unmittelbar neben diesen CRISPR Sequenzen kodiert ist und entsprechend mit Cas (*CRISPR associated*) bezeichnet wurde. Die Forschergruppe zeigte, dass Cas eine Nuklease ist, also ein Enzym, das DNA schneiden kann. Es sollte aber noch ein paar Jahre dauern, bis klar wurde, dass das Cas-Gen mit den benachbarten CRISPR Sequenzen in funktionellem Zusammenhang steht und wie dieses Enzym an die jeweiligen Zielsequenzen geleitet wird.

Parallel zu diesen Forschungsaktivitäten entwickelte sich die Sequenzieretechnologie weiter. Mit der Einführung des ‚Next Generation Sequencing‘ wurde ein Durchbruch erzielt, der die schnellere und kostengünstige Entschlüsselung auch von größeren Sequenzabschnitten erlaubte. So wurde 1995 erstmals ein in der Natur vorkommendes Bakterium vollständig entschlüsselt und in den Folgejahren wuchs die Zahl der analysierten Organismen kontinuierlich an. Mit Beginn dieses Jahrtausends waren schließlich auch Genome komplexerer Organismen entschlüsselt, so auch das menschliche Genom. Die Genomsequenzen der verschiedenen Spezies wurden in Datenbanken abgelegt und durch parallel entwickelte bioinformatische Verfahren der Analyse zugänglich.

Das Interesse von Francisco Mojica – inzwischen der führende Wissenschaftler in dem Feld – verschob sich inzwischen von den sich wiederholenden Sequenzabschnitten auf die jeweils unterschiedlichen ‚Unterbrechungssequenzen‘. Als er diese Unterbrechungssequenzen mit den in den Datenbanken abgelegten Sequenzen der anderen Organismen verglich, fand er exakt dieselbe Abfolge im Erbgut eines zuvor entschlüsselten Virus, das viele Bakterien befallen kann – eine verblüffende Beobachtung. Dabei stammte die Unterbrechungssequenz aus einem Bakterium, das immun gegenüber diesen Viren war. Daraus entwickelte Francisco Mojica die Hypothese, dass diese Sequenzen dem Bakterium Immunität gegenüber diesen Viren verleihen können.

Der nächste Schritt auf dem Weg zur Entschlüsselung des CRISPR/Cas-Systems kam interessanterweise nicht aus der mikrobiologischen Grundlagenforschung selbst, sondern war vielmehr wirtschaftlich motiviert. Er ergab sich aus einem Problem in einer französischen Firma, die Milchprodukte herstellte. Zur Produktion von Milchprodukten werden Milchsäurebakterien eingesetzt. Diese können von Bakterienviren (sogenannte Bakteriophagen) infiziert und zerstört werden, wodurch es zu teuren Produktionsausfällen kommt. Um hier eine Lösung zu finden, beauftragte die Firma zwei Wissenschaftler, Philippe Horvath und Rodolphe Barrangou, sich diesem Problem anzunehmen. Horvath und Barrangou stießen dabei ebenfalls auf den ungewöhnlichen Einbau von Virussequenzen in das Genom der Milchsäurebakterien. Nach weiteren Forschungsarbeiten erbrachten sie schließlich in 2007 den experimentellen Nachweis dafür, dass die eingebauten viralen Sequenzen die Bakterien tatsächlich resistent gegenüber den Virusinfektionen machen. Damit war bestätigt, dass diese Sequenzen den Bakterien Immunität verleihen. Auch erkannten sie, dass für die Immunität der Bakterien das Cas-Gen erforderlich ist.

Basierend auf den gemeinsamen Aktivitäten einer niederländisch/amerikanischen Forschungsgruppe konnte kurze Zeit später gezeigt werden, dass die CRISPR Sequenzwiederholungen zusammen mit den dazwischenliegenden Unterbrechungssequenzen durch eine Polymerase abgelesen (transkribiert) und in RNA übersetzt wird. Die Wissenschaftler konnten nachweisen, dass die zunächst entstehende lange RNA Kopie in kleine Abschnitte von 61 Nucleotiden geschnitten wird, die sogenannte crRNAs. Diese kurzen RNAs beinhalten dabei jeweils eine der (viralen) ‚Unterbrechungssequenzen‘, die von Teilen der Wiederholungssequenzen flankiert werden.

In 2008 war dann durch die Forschungsaktivitäten einer weiteren amerikanischen Gruppe um Luciano Marraffini und Eric Sondheimer klar, wie das CRISPR/Cas-System Bakterien vor Viren schützt: Wenn ein Bakterium eine Virusinfektion überlebt, werden kleine Stücke der viralen DNA in den CRISPR Locus im Bakteriengenom eingebaut. Die daraus gebildeten kleinen crRNAs sind zu einem



Teil der viralen DNA komplementär. Wird das Bakterium dann ein weiteres Mal infiziert, kann das Cas9-Enzym die Virus-DNA schneiden und damit zerstören – das Virus ist unschädlich gemacht, das Bakterium ist resistent. Gleichzeitig wurde durch die Forschungsaktivitäten von Marraffini und Sondheimer klar, dass CRISPR/Cas im Wesentlichen ein programmierbares Restriktionsenzym ist, das also DNA an einer beliebigen Stelle schneiden kann. Schon damals vermuten die amerikanischen Forscher, dass dieses System nicht nur in Bakterien funktioniert, sondern auch in andere, komplexere Organismen übertragen und so zum gezielten Schneiden von DNA eingesetzt werden könnte. Allerdings konnten sie das zu dem Zeitpunkt nicht beweisen.

Auch fehlte noch ein weiterer wesentlicher Baustein für das Werkzeug – es war noch immer nicht bekannt, wie genau das Cas9-Enzym an das Virusgenom geleitet wird. Die Auflösung dieses Rätsels kam dann aus einer Forschungsaktivität um Emmanuelle Charpentier, die damals an der Universität in Wien an kleinen regulatorischen RNAs in dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* forschte. Sie traf auf Jörg Vogel, der seinerzeit am Max-Planck-Institut in Berlin arbeitete und eine neue Sequenziermethode zur Identifizierung und Quantifizierung von kleinen RNAs entwickelt hat. Zusammen beschlossen sie, diese Methode auch für *Streptococcus pyogenes* anzuwenden. Das Ergebnis war überraschend: sie identifizierten eine kurze RNA (später wurde sie tracrRNA genannt), die in ungewöhnlich hoher Zahl in Bakterien vorliegt, also sehr effizient transkribiert wird. Die weitere Charakterisierung leitete die beiden Forscher in das CRISPR Feld – sie wiesen nach, dass die tracrRNA von einem Genomabschnitt kodiert wird, der direkt neben dem CRISPR locus liegt. Auch war es verblüffend, dass diese tracrRNA eine nahezu perfekte Übereinstimmung von 25 Basenpaaren zu den Sequenzwiederholungen im CRISPR locus aufweist. Durch die Komplementarität der tracrRNA mit der crRNA entsteht ein Komplex, der an das Cas-Protein bindet und es somit an die Zielsequenz leiten kann.

Damit waren in 2011 alle Komponenten des CRISPR/Cas-Systems entdeckt und beschrieben. Die Hypothese, mit diesem System gezielt das Genom anderer Zellen zu schneiden und damit zu verändern, bekam immer mehr Unterstützung. Aber noch hatte niemand das CRISPR/Cas-System aus seinem bakteriellen Kontext gelöst und zum Werkzeug für die gezielte Modifikation von DNA gemacht. Eine der Gruppen, der dies schließlich gelang, war das Team um Virginijus Šikšnyš von der Universität Vilnius (Litauen), der zusammen mit Horvath und Barrangou das System von einem Bakterium in ein anderes transferierte. Auch identifizierte die Gruppe das minimale Set an nötigen Elementen, um eine beliebige Sequenz zu schneiden. Sie reichten ihre Studie bereits im April 2012 zur Publikation ein – jedoch wurde die Arbeit zunächst nicht akzeptiert und so verzögerte sich die Veröffentlichung.

Parallel und völlig unabhängig davon taten sich Emmanuelle Charpentier und die RNA Expertin Jennifer Doudna aus Berkeley zusammen, um ihre Aktivitäten zu bündeln und schnell zum Ziel zu kommen. Wie Šikšnyš gelang auch ihnen der Nachweis, dass rekombinantes Cas9 zusammen mit synthetisch hergestellten, auf die Zielsequenz angepasste tracr/crRNA Komplexen *in vitro* gezielt DNA schneiden kann. Auch zeigten sie, dass die tracr/crRNAs zu einer einzelnen RNA (single guide RNA, sgRNA) fusioniert werden kann. Charpentier und Doudna reichten im Juni 2012 ihre Erkenntnisse zur Publikation ein. Ihre Studie durchlief den Begutachtungsprozess sehr schnell und wurde noch im selben Monat veröffentlicht. Mit dieser Publikation gewannen Charpentier und Doudna den Wettlauf. Die Arbeiten des Teams um Virginijus Šikšnyš sollte dann wenige Wochen später im September veröffentlicht werden.

Sowohl die Gruppe um Charpentier/Doudna als auch die Gruppe um Šikšnyš erkannten das Potenzial dieser Methode für die Biotechnologie. Der Beweis, dass das bakterielle CRISPR/Cas-System auch in Säugerzellen eingesetzt werden kann, gelang schließlich nur wenige Monate später den beiden



amerikanischen Forschergruppen um Feng Zhang und um George Church. Sie zeigten praktisch zeitgleich, dass das CRISPR/Cas-System in menschliche Zellen transferiert und dort zur Manipulation des Erbguts eingesetzt werden kann. Somit war das Werkzeug in all seinen Elementen beschrieben und seine Anwendung für die Manipulation in komplexen Organismen gezeigt.

Die Geschichte der Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems ist aus verschiedenen Gründen interessant. Sie ist ein gutes Beispiel dafür, dass eine derartig neue Entdeckung häufig nicht auf einen spontanen Geistesblitz einer einzelnen Person zurückgeht, sondern das Ergebnis jahrelanger Forschungsaktivitäten ist, an denen viele Labors (häufig auch im internationalen Wettstreit) beteiligt sind. Nicht zuletzt bricht diese Geschichte aber auch eine Lanze für die Hypothesen-getriebene (Grundlagen-)Forschung, bei der ein gewinnbringender Nutzen oft zunächst nicht abzusehen ist und der sich – wenn überhaupt – eher zufällig einstellt.

Literatur

LANDER, E. (2016): The heroes of Crispr, *Cell* **164**, 19-28.